

Electrochemical detection of amines using a wall-jet cell

Freddy Atencio, Graciela González y Avismelsi Prieto

Laboratorio de Electroquímica, Ciclo Básico, Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia
Apartado 526. Maracaibo, Venezuela

Abstract

A wall-jet electrochemical detector cell with an internal volume of 12 μl built and evaluated in the laboratory. It consists of a vitreous carbon working electrode and an Ag/Ag⁺ ion and Pt as the reference and counter electrodes, respectively. The detector was evaluated in stationary conditions by anodic linear voltammetry of the aniline. A half-wave potential of +540 mV and maximum faradic current at +800 mV were found.

In hydrodynamic conditions, voltammetry of 40 ng of standard aniline solution indicated maximum faradic current values between +600 and +800 mV. Reaction of the aniline oxidation by this latter technique yielded an average current value of 855.5 nA with a standard deviation of ± 7.5 nA for 40 ng of aniline solution.

In its evaluation as an electrochemical detector in HPLC, the wall-jet cell succeeded in detecting catecholamines, such as Norepinefrine (NE), Epinephrine (E), Dopamine (DA) and a metabolite, 3-4-dihydroxyphenyl acetic acid (DOPAC), with good resolution.

Key words: Electrochemical detection, catecholamines.

Detección electroquímica de aminas utilizando una celda wall-jet

Resumen

Se construyó y evaluó un detector electroquímico tipo wall-jet con volumen interno de 12 μl , con electrodo de trabajo de carbón vítreo, electrodo de referencia Ag / Ag⁺ y electrodo auxiliar de platino. El detector fue evaluado en condiciones estacionarias mediante voltametría lineal anódica de la anilina, observándose un potencial de media onda de +540 mV y máxima corriente faradaica a +800 mV.

La voltametría en condiciones hidrodinámicas de 40 ng de anilina indicó valores máximos de corriente faradaica entre +600 y +800 mV. Los ensayos de reproducibilidad mostraron una corriente media de 858.5 ± 7.5 nA.

En la evaluación de la celda wall-jet como detector electroquímico en HPLC se logró la detección de las catecolaminas Norepinefrina (NE), Epinefrina (E), Dopamina (DA) y un metabolito, el ácido 3-4-dihidroxifenil acético (DOPAC) con buena resolución.

Palabras claves: Detección electroquímica, catecolaminas.

Introducción

El análisis mediante flujo con inyección (FIA) y la cromatografía líquida (LC) están basados en principios hidrodinámicos comunes [1]. Esta semejanza permite la evaluación de detectores cromatográficos mediante FIA como paso

previo a su utilización en una técnica más compleja como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

A la detección electroquímica se le atribuye alta sensibilidad y selectividad, lo cual la hace competitiva con los sistemas de detección tradi-

cionalmente utilizados en FIA y en HPLC; a pesar de las limitaciones que impone en la composición de la fase móvil. Su alta sensibilidad se le atribuye a que funcionan amperométricamente [2-3]. La amperometría es una técnica electroquímica donde se registra la corriente generada (en forma de pico) por una reacción redox del analito a un potencial fijo, previamente seleccionado con base en una voltametría lineal del mismo. La selección apropiada del potencial de trabajo determina la selectividad y sensibilidad del ensayo.

En este trabajo se describe el desarrollo de un modelo de celda electroquímica tipo wall-jet donde se han mantenido criterios planteados por algunos autores [4-5] tales como el poseer un volumen pequeño, trabajar en condiciones de flujo laminar y, utilizar un electrodo de trabajo de área pequeña. A su vez, se incorporaron algunas modificaciones respecto a los detectores electroquímicos comerciales, tales como las posiciones relativas de los electrodos, y la utilización de un electrodo de referencia Ag/Ag^+ en un medio orgánico.

La celda wall-jet se utilizó como detector electroquímico en la oxidación voltamétrica de soluciones de anilina y en la detección de catecolaminas separadas mediante HPLC.

Procedimiento Experimental

Construcción del detector electroquímico

Se construyó un detector electroquímico con geometría wall-jet de volumen interno $12 \mu\text{l}$ tomando como referencia las dimensiones y distribución de una celda diseñada previamente [6]. El cuerpo de la celda está formado por 2 bloques de teflón de dimensiones $15.0 \times 20.0 \times 28.8$ (mm) de altura, profundidad y longitud, respectivamente (ver Figura 1), donde se ubicaron sus componentes. El electrodo de referencia es del tipo Ag/Ag^+ con la siguiente composición: $Ag/AgNO_3$ (10^{-2} M), $KClO_4$ (10^{-2} M), metanol / agua (1:1). El comportamiento de este tipo de electrodo fue estudiado [6] y el mismo mostró buena reversibilidad y estabilidad.

El electrodo de trabajo es un cilindro de carbón vítreo grado GC-10 (Tokai Electrode Manufacturing Co., Tokio) de 3.5 mm de altura y

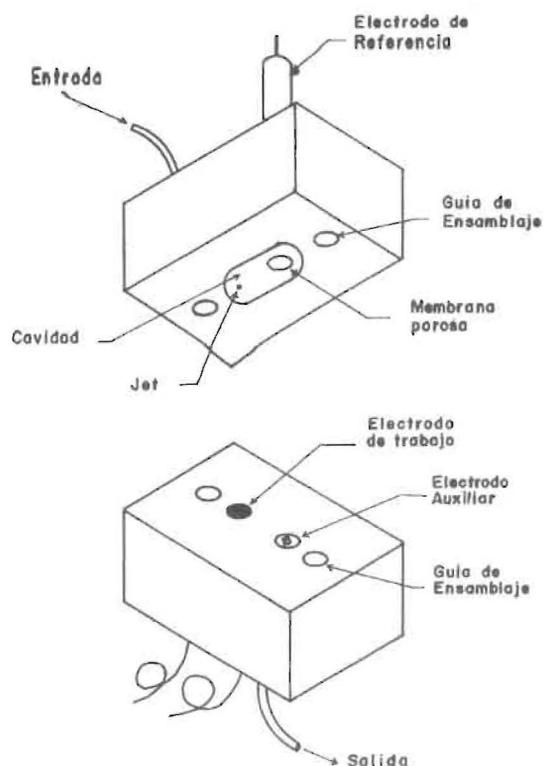


Figura 1. Componentes de la celda wall-jet.

3.06 mm de diámetro con un área geométrica útil de 7.35 mm^2 . Su superficie fue pulida con papel de carburo de silicio N° 600 y con alúmina de 1.0, 0.5 y $0.3 \mu\text{m}$, hasta obtener superficie de espejo.

El electrodo auxiliar es un alambre de platino de forma helicoidal y se ubicó a la salida del flujo. Los electrodos se mantienen en contacto electrolítico mediante el volumen de disolución contenido en la celda ($12 \mu\text{l}$). La proximidad de los tres electrodos asegura baja resistencia interna en el detector, tal como ha sido demostrado anteriormente [5].

Evaluación de la celda en condiciones estacionarias

Utilizando una jeringa hipodérmica, se llenó la celda con disolución del electrolito inerte (blanco) constituida por $KClO_4$ (10^{-2} M) en metanol / agua (4:1), electrolito éste apropiado para la oxidación de aminas [7]. Se realizó una voltametría lineal anódica (polarógrafo PAR 174) del blanco en el intervalo -0.200 V a $+1.250 \text{ V}$ a una velocidad de polarización de 10 mV/s . La

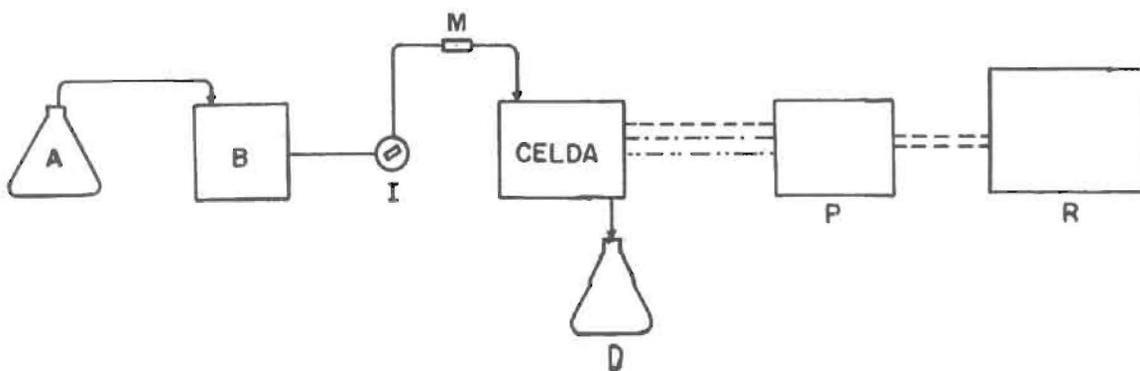
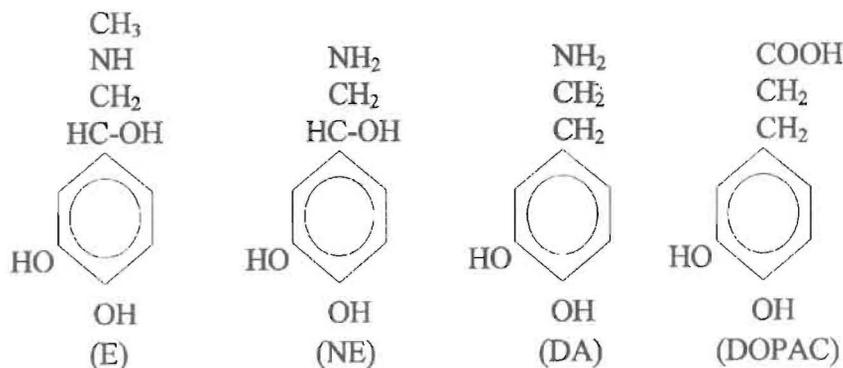


Figura 2. Sistema de flujo continuo con inyección (FIA). A: Solvente; B: Bomba peristáltica; I: Inyector; M: Minicolumna C₁₈; D: Desague; P: Polarógrafo PAR; R: Registrador XT.



voltametría se repitió hasta obtener señales reproducibles, generalmente después del segundo barrido. Luego la disolución interna de la celda se cambió por disolución de anilina de concentración 100 mg/l, teniendo como solvente la misma composición del blanco y, se realizó una voltametría anódica en las mismas condiciones fijadas para el blanco.

Evaluación de la celda en condiciones hidrodinámicas

La celda se instaló en un sistema de flujo continuo con inyección (Figura 2) donde se utilizó como eluyente una disolución de igual composición que el electrolito inerte (blanco) del procedimiento anterior. El sistema se operó a un caudal de 1.2 ml/min hasta obtener una línea base estable a un potencial de + 400 mV vs. Ag/Ag⁺. Se hicieron 10 inyecciones de 10 µl c/u de disolución de anilina de concentración 10 mg/l con el solvente de igual composición que el eluyente. Posteriormente se hicieron inyecciones manteniendo el potencial a +500, +600, +700,

+800 y +900 mV a fin de obtener un voltamograma potencioestático hidrodinámico. Se seleccionaron los parámetros operacionales y se hicieron 20 inyecciones sucesivas de disolución de anilina de concentración 10 mg/l observando la reproducibilidad de la señal.

Evaluación de la celda en un sistema cromatográfico (HPLC)

Se utilizó un equipo cromatográfico compuesto de una bomba isocrática (Dupont 8800), un inyector con loop de carga de 5 µl (Rheodyne 7125), un controlador amperométrico (BAS LC - 4B), una estación de datos Perkin - Elmer 3600 con impresora y la celda electroquímica como detector. Se seleccionó la técnica de cromatografía en fase reversa en una columna con fase estacionaria C₁₈.

Por su interés biológico [8-10], se seleccionó para su detección un grupo de catecolaminas: epinefrina (E), norepinefrina (NE), dopamina (DA) y un derivado de la misma, el ácido 3-4 dihidroxifenil acético (DOPAC).

Se preparó una solución madre de cada catecolamina a una concentración 10^{-3} M en HCl 0.5 M y cada día de trabajo se prepararon las correspondientes soluciones patrón diluyendo 30 μ l de NE, 40 μ l de DA, 45 μ l de DOPAC y 35 μ l de E, cada una hasta 10 ml en metanol-agua 7:3.

Como ensayo previo a la separación cromatográfica, se realizó un voltamograma hidrodinámico para cada solución patrón individualmente con el detector wall-jet acoplado al cromatógrafo, utilizando como fase móvil metanol-agua 7: 3 y 2 g de KNO_3 por litro de solución como electrolito inerte. Se estabilizó el equipo a un caudal de 1.0 ml/min y potencial de +500 mV vs. Ag/Ag^+ y se inyectaron las catecolaminas en forma individual. El procedimiento se repitió para potenciales entre +500 y +800 mV seleccionándose el potencial apropiado para la detección cromatográfica.

Se preparó una mezcla de las soluciones patrón utilizando 2.5 ml de cada una para un volumen total de 10 ml. Como fase móvil para la separación de las catecolaminas se seleccionó una mezcla de ácido monocloroacético 0.15 M, pH 3.8, ácido 1-octanosulfónico 0.86 mM, EDTA 0.67 mM, 2% metanol v/v y 3% acetonitrilo v/v. El potencial de oxidación fue +600 mV.

Resultados y Discusión

En condiciones estacionarias la celda produjo voltamogramas reproducibles para la oxidación de la anilina. La Figura 3 muestra un voltamograma típico obtenido para la anilina con un potencial de media onda de +500 mV, comparable a los valores reportados en celdas polarográficas convencionales [7]. Sustrayendo la corriente del blanco en el voltamograma, se obtuvo analíticamente la gráfica de corriente faradaica vs. potencial (Figura 4), la cual indica que a valores de potencial cercanos a +800 mV se registró la máxima corriente faradaica, producto de la oxidación de la anilina en las condiciones operacionales establecidas.

La voltametría hidrodinámica obtenida potencioestáticamente mostró un valor máximo de corriente faradaica para un potencial de +700 mV como puede observarse en la Figura 5, siendo este el potencial utilizado para estudiar la reproducibilidad de la respuesta del detector. El

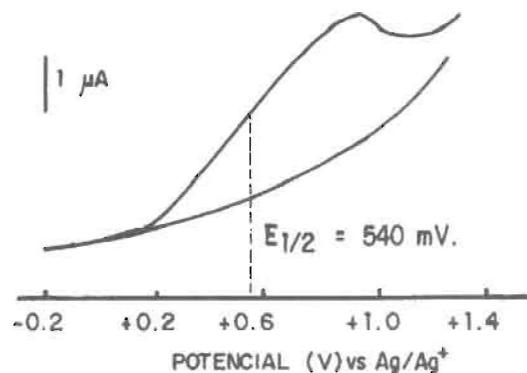


Figura 3. Voltamograma de la anilina (100 mg/l) con solución 10 M^{-2} KClO_4 en metanol/agua (4:1); 10 mV/s.

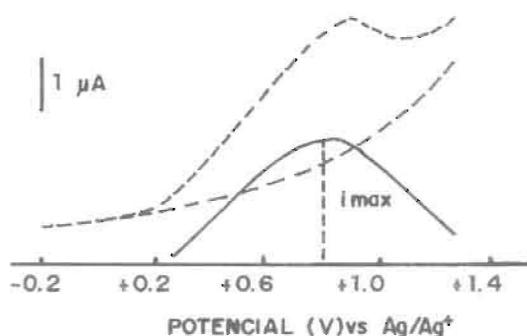


Figura 4. Corriente faradaica de la solución de anilina (Fig. 3) vs. Potencial (curva continua).

ensayo de reproducibilidad (Figura 6) muestra una corriente media de 858.5 nA con desviación estandar de 7.5 nA. La buena precisión de los resultados demuestra que la superficie del electrodo de trabajo no se pasivó durante la repetición de las inyecciones de anilina. La línea base se recupera rápidamente, lo cual indica ausencia de efectos de memoria y corto tiempo de respuesta del detector.

La voltametría potencioestática hidrodinámica de catecolaminas (Figura 7) demuestra que bajo las condiciones operacionales fijadas, el potencial de control no es un valor crítico, puede

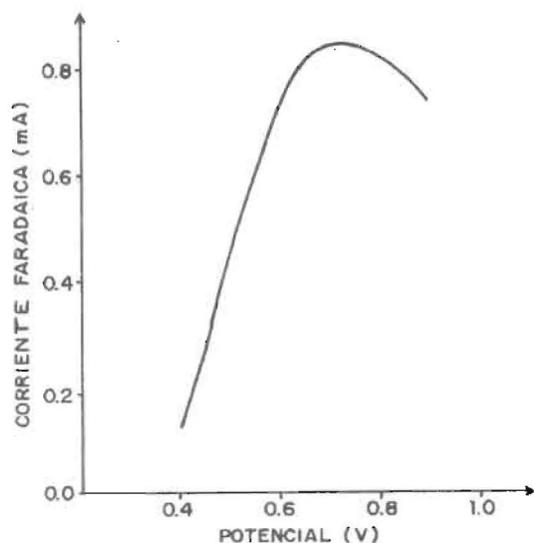


Figura 5. Voltametría potenciostática hidrodinámica de 10 µl de solución 10 mg/l de anilina. Electrolito inerte y eluyente (1.2 ml/min) 10⁻²M KClO₄ en metanol agua (4:1).

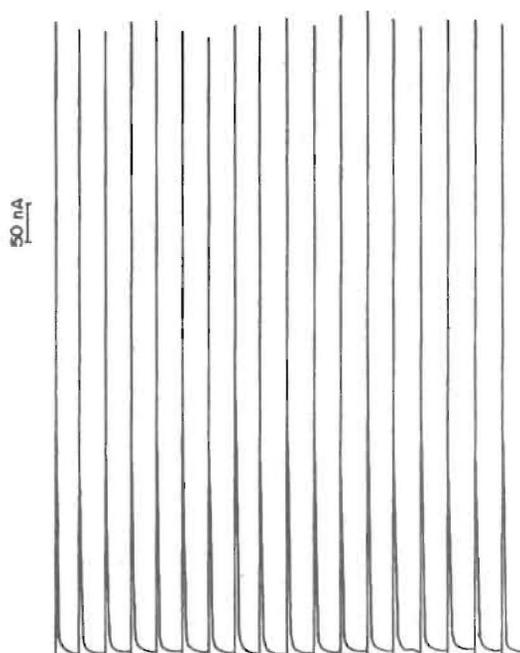


Figura 6. Ensayo de reproducibilidad de la anilina en el sistema FIA. Inyección de 10 µl de solución 10 mg/l de anilina. Electrolito inerte y eluyente (1.2 ml/min) similar al de la Fig. 5. Potencial fijo: 0.700 V.

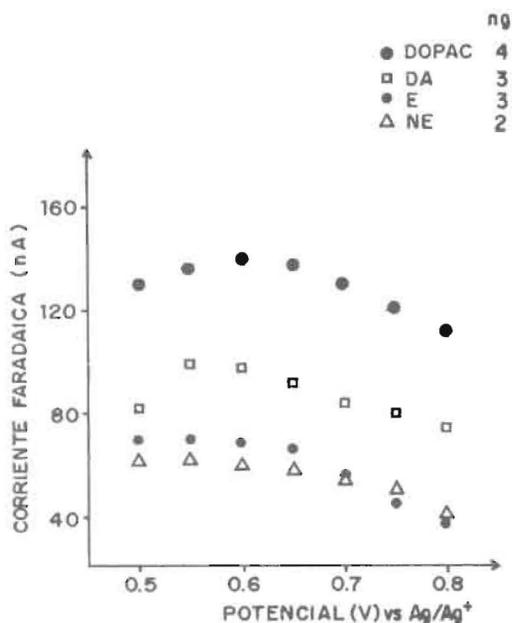


Figura 7. Voltametría hidrodinámica de catecolaminas (individual) en el sistema HPLC. 1 ml/min.

observarse un intervalo de potencial entre +550 mV y +650 mV que no compromete la sensibilidad del detector para cada catecolamina. Con la solución de ácido monocloroacético utilizado en la fase móvil a pH 3.8 se consiguió completa separación de las catecolaminas (Figura 8) con buena resolución y tiempos de retención de 2.82, 4.32, 6.73 y 9.07 min. para las catecolaminas NE, E, DOPAC y DA respectivamente.

Conclusiones

La celda generó señales reproducibles tanto en condiciones estacionarias como en condiciones hidrodinámicas.

La superficie del electrodo de trabajo no se pasivó durante la oxidación de la anilina ni de las catecolaminas.

En ningún momento se manifestaron efectos de memoria en la respuesta del sensor.

La celda electroquímica operó como detector electroquímico en la separación de cuatro

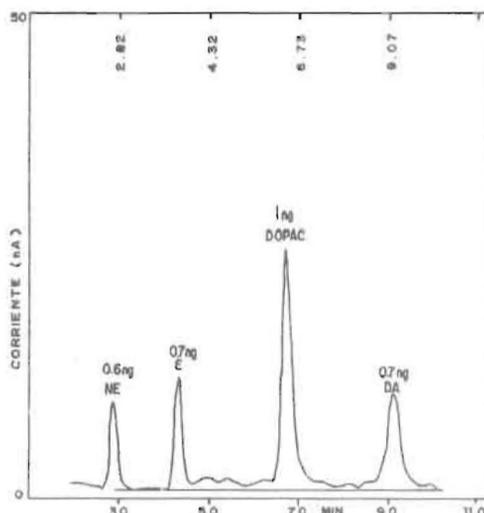


Figura 8. Cromatograma de catecolaminas. Fase móvil: ácido monocloroacético 0.15 M, pH 3.8, ácido 1-octanosulfónico 0.86 mM, EDTA 0.67 mM, 2% metanol (v/v), 3% acetonitrilo (v/v). Potencial de oxidación: +700 mV. 1 ml/min.

catecolaminas mediante HPLC con resultados satisfactorios.

Agradecimiento

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES) por el financiamiento de este proyecto.

Al personal del taller de mecánica de la Facultad de Ingeniería de la Universidad del Zulia por el maquinado de la celda.

Al CONICIT por la donación de algunos equipos.

Referencias Bibliográficas

1. Stulik, K.: Electrochemical detection for flow analysis and liquid chromatography: present status and some roads to the future. *Anal. Chim. Acta.* 273 (1993) 435-441.
2. Coelho, A.M.: Electroanalytical estimation of herbicides. London, Imperial College of Science and Technology. PhD. Thesis. (1980) 143.
3. Wang, J.; Feiha, B.A.: Vitreous carbon-based composite electrode as an electrochemical detector for liquid chromatography. *J. of Chromatg.* 16:298 (1984) 79-87.
4. González G.: Comportamiento electroquímico de fluidos wall-jet. Universidad del Zulia. Trabajo de Ascenso (1981).
5. Law, B.; Gill, R.: Construction of a simple wall-jet electrochemical flow-cell for HPLC. *J. of Chromatog.* 325 (1985) 294-298
6. Atencio, F.: Desarrollo de un detector amperométrico para HPLC. Universidad del Zulia. Trabajo de Ascenso (1989).
7. Pérez, E. Y.: Optimización de parámetros experimentales en la voltametría de aminas aromáticas. Universidad del Zulia. Trabajo Especial de Grado (1987).
8. Jussoffe, A.; Lojewski, J.; Hienke, C.: Simultaneous automated determination of catecholamines, serotonin and their metabolites in brain tissue by HPLC and electrochemical detection. *J. Liq. Chrom.* 16 (2) (1993) 447-463
9. Cooper, B. R.; Jankowski, J. A.: Quantitative determination of catecholamines in individual bovine adrenomedullary cells with reversed-phase microcolumn liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal. Chem.* 64(6) (1992) 691-694.
10. Britt-Marie E.: Determination of catecholamines in rat heart tissue and plasma samples by liquid chromatography with electrochemical detection. *J. of Chrom.* 612 (1993) 1-5.

Recibido el 16 de Mayo de 1995

En forma revisada el 28 de Septiembre de 1995